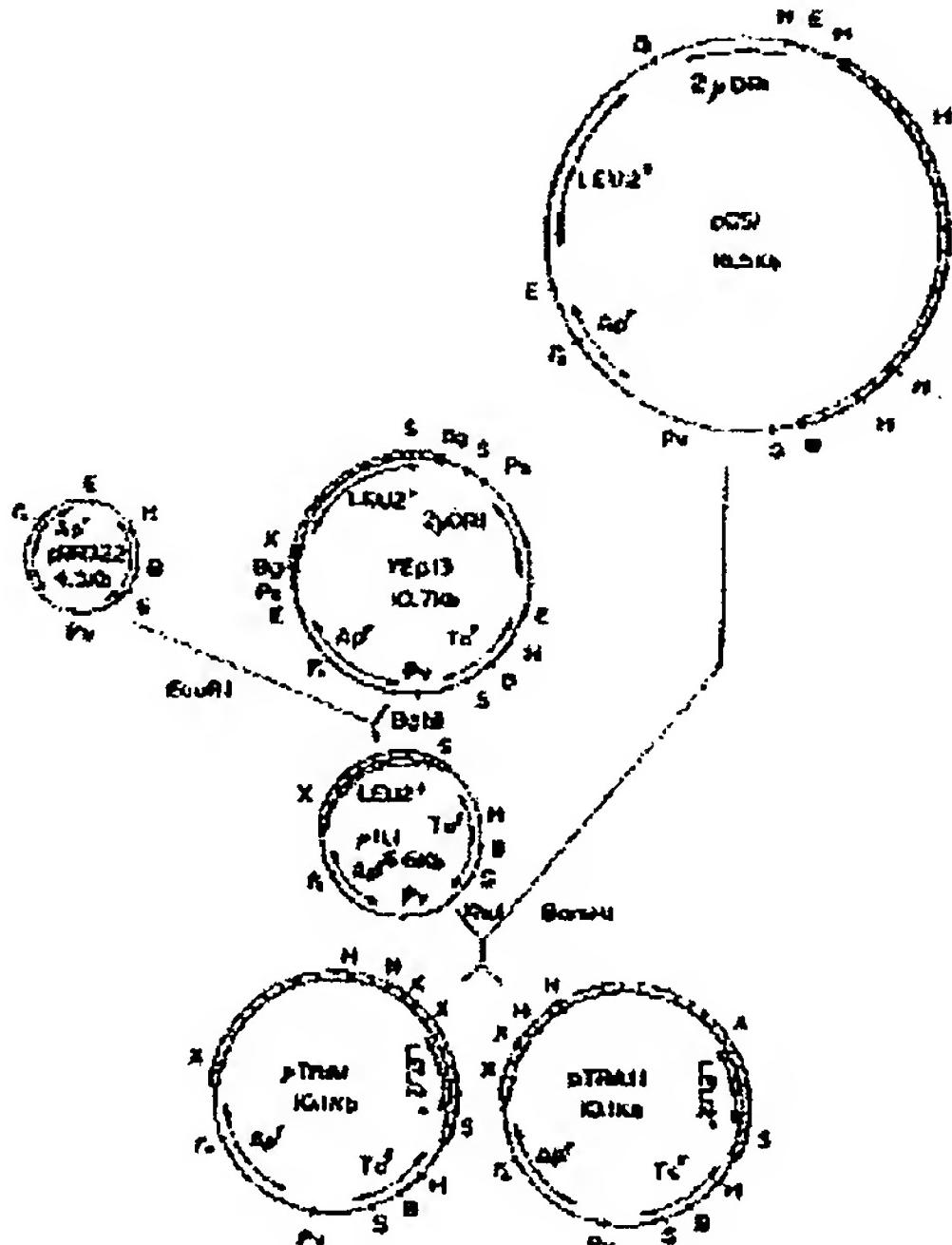


BEST AVAILABLE COPY**PLASMID AND PRODUCTION THEREOF****Publication number:** JP62074288**Publication date:** 1987-04-06**Inventor:** TAKAGI MASAMICHI; YANO KEIJI; SHIBUYA ICHIRO;
MORIKAWA MINORU**Applicant:** NIKKA WHISKY**Classification:****- International:** C12N15/09; C12N15/81; C12R1/19; C12R1/72;
C12R1/865; C12N15/09; C12N15/81; (IPC1-7):
C12N15/00; C12R1/19; C12R1/72; C12R1/865**- european:** C12N15/81**Application number:** JP19850212188 19850927**Priority number(s):** JP19850212188 19850927**Report a data error here****Abstract of JP62074288**

PURPOSE: A shuttle vector, containing an autoreplication sequence of *Candida maltosa*, Leu2 gene derived from *Saccharomyces cerevisiae*, ampicillin-resistant gene and tetracyclin-resistant gene and having a wide region of hosts. **CONSTITUTION:** A gene library of *Candida maltosa* is prepared by using a vector YEp13 of *Saccharomyces cerevisiae* and transformed by using *Candida maltosa* having requirement for leucine as a host. A plasmid is separated from the resultant transformant to transform *Escherichia coli*. An ampicillin-resistant plasmid is then separated to isolate a region (TRA region) required for transforming *Candida maltosa* with a restriction enzyme BamHI. The vector YEp13 is cleaved by a restriction enzyme BgIII and a vector pBR322 of *Escherichia coli* is cleaved by a restriction enzyme EcoRI. Both are then linked and the resultant linked plasmid is cleaved by a restriction enzyme Xhol and linked to the TRA region.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑮ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭62-74288

⑯ Int.Cl.⁴

C 12 N 15/00
//C 12 N 15/00
C 12 R 1:865
1:72
1:19)

識別記号

厅内整理番号

7115-4B

⑯ 公開 昭和62年(1987)4月6日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑯ 発明の名称 プラスミドとその製法

⑯ 特願 昭60-212188

⑯ 出願 昭60(1985)9月27日

⑯ 発明者 高木 正道 東京都府中市栄町1-31-10

⑯ 発明者 矢野 圭司 東京都北区滝野川1-41-3

⑯ 発明者 渋谷 一郎 柏市東中新宿4-1-2-206

⑯ 発明者 森川 実 柏市東中新宿4-1-2-105

⑯ 出願人 ニッカウキスキュー株式 東京都港区南青山5丁目4番31号

会社

⑯ 代理人 弁理士 渡邊 一平

明細書

1. 発明の名称

プラスミドとその製法

2. 特許請求の範囲

(1) キヤンティダーマルトーサの自己複製配列、
サツカロマイセス セレビジエ由来の Leu 2 遺伝子、アンビシリントリニン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子を含んで成るプラスミド。

(2) 下記(a)～(f)の工程を含むことを特徴とするプラスミドの製法。

(a) サツカロマイセス セレビジエのベクター YEp13 (Leu 2 遺伝子を含む) を用いてキヤンティダーマルトーサのシーンライブライマーを作製する。

(b) 次いで、該シーンライブライマーをロイシン要求性キヤンティダーマルトーサを宿主として形質転換する。

(c) 得られた形質転換体からプラスミドを分離して大腸菌に形質転換し、アンビシリントリニン耐性のプラスミドを分離する。

(d) 該アンビシリントリニン耐性プラスミドを制限酵素 BamHI により切断し、キヤンティダーマルトーサの形質転換に必要な領域を単離する。

(e) サツカロマイセス セレビジエ由来のベクター YEp13 (Leu 2 を含む) を制限酵素 BglII にて切断して Leu 2 遺伝子を単離し、また大腸菌のベクター pBR322 を制限酵素 EcoRI で切断し、両者を連結させる。

(f) (e) で連結されたプラスミドを制限酵素 XbaI で切断し、前記(d)で単離した領域と連結させる。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は大腸菌及び複数の種類の酵母を宿主とすることができるプラスミド、即ちシャトルベクターとその製法に関する。

[従来の技術]

近年、分子生物学及び遺伝子工学の発展を背景に組換えDNAの手法を用いて有用な物質を生み出す方法が脚光を浴びている。有用物質を生産す

BEST AVAILABLE COPY

特開昭62-74288(2)

る手段の一つとして、あるいは有用遺伝子を微生物に組込む方法として、プラスミドに目的とする遺伝子を挿入し、宿主菌を形質転換させることが常法である。その際、酵母を形質転換させることの頻度の低さを補うため、プラスミドを大量に分離することを目的として、大腸菌を形質転換させ、同時に酵母をも形質転換させることができるベクター（これは特にシャトルベクターと呼ばれる）が必須である。すでに大腸菌とサツカロマイセスセレビジエ（酵母の一種）間のシャトルベクターについての報告がある。（例えば YEp 13（ブローチ、ジェイ・アール・ストラザーン、ジェイ・エヌ・ヒックス、ジェイ・ビー・ジーン（*Broach, J.R., Strathern, J.N., Hicks, J.B., Gene*），8, 121 (1979)）や YRp 7（ストルール、ケイ・スチングコム、ディー・ディー・シエラー、エス・ディビス、アール・ダブリューのプロシードイング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス（*Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., Davis, R.W., Proc. Natl. Acad.*）。

さらに本発明によれば、下記(i)～(f)の工程を含むことを特徴とするプラスミドの製法が提供される。

- (a) サツカロマイセス セレビジエのベクター YEp 13（Leu 2 遺伝子を含む）を用いてキヤンディダ マルトーサのジーンライプラリーを作製する。
- (b) 次いで、該ジーンライプラリーをロイシン要求性キヤンディダ マルトーサを宿主として形質転換する。
- (c) 得られた形質転換体からプラスミドを分離して大腸菌に形質転換しアンピシリン耐性のプラスミドを分離する。
- (d) 該アンピシリン耐性プラスミドを制限酵素 BamH I により切断し、キヤンディダ マルトーサの形質転換に必要な領域（TRA領域と称する）を単離する。
- (e) サツカロマイセス セレビジエ由来のベクター YEp 13（Leu 2 を含む）を制限酵素 Bgl II にて切断して Leu 2 遺伝子を単離し、また大腸

Sci.）, 76, 1035 (1979)）

（発明が解決しようとする問題点）

しかしながら、従来よりもさらに宿主域が広いシャトルベクターが要望されており、そこで本発明者らは酵母の一種ではあるがサツカロマイセスセレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) とは異種のキヤンディダ マルトーサ (*Candida maltoza*) からの自己複製配列 (Autonomously Replicating Sequences) (以下、ARS という) に着目し、これをを利用して大腸菌とキヤンディダ マルトーサ間だけでなく、さらにサツカロマイセス セレビジエにおいても安定に維持される三者間のシャトルベクターとなり得るプラスミドを作製することを試み、成功したものである。

（問題点を解決するための手段）

上記目的を達成するため、本発明によればキヤンディダ マルトーサの自己複製配列、サツカロマイセス セレビジエ由来の Leu 2 遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子を含んで成るプラスミドが提供される。

菌のベクター pBR322 を制限酵素 EcoR I で切断し、両者を連結させる。

(f) (e) で連結されたプラスミドを制限酵素 Xba I で切断し、前記(d)で単離した TRA 領域と連結させる。

ここで ARS とは、ある DNA 断片及び自己断片の自律増殖を可能にする DNA 断片を意味する。

本発明のプラスミド、即ちシャトルベクターに外来有用遺伝子を挿入し、大腸菌を形質転換させて大量のプラスミドを得、これを用いてサツカロマイセス セレビジエ又はキヤンディダ マルトーサを宿主菌として有用物質（例えば、ホルモンや酵素）を生産することが可能となる。尚、外来的有用遺伝子としては動物や植物からだけでなく、前述のサツカロマイセス セレビジエやキヤンディダ マルトーサらの酵母細菌体並びに大腸菌等バクテリアが持つ遺伝子も含まれる。

本発明の新規なプラスミドは、例えば以下の通り作製される。

サツカロマイセス セレビジエのベクター YEp

BEST AVAILABLE COPY

特開昭62-74288(3)

13 (Leu 2を含む)を制限酵素BamHIにて切断する。その切断位置にキヤンティダ マルトーサの全DNAを制限酵素Sau3AIで部分切断した断片を挿入し、大腸菌に形質転換を行いアンビシリン(Ap)耐性、テトラサイクリン(Tc)感受性となつたものを選択し、これより各々プラスミドDNAを分離しジーンライブラリーとした。

次に該ジーンライブラリーをロイシン要求性のキヤンティダ マルトーサJ288株を宿主としてヒンネン等のプロトプラスト法(ヒンネン、ヒックス、フインクのプロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(Hin-nen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 1929(1978))を用いて形質転換させ、ロイシンを含まない最少培地(下記の組成)上で増殖させた。

酵母用アミノ酸不含窒素源(Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid)(ディフコ(Difco)社製)	0.67%
グルコース	2%
ソルビトール	1.2M

酵素EcoRIで切断し、両者を連結反応させプラスミドを作製する。そしてこのプラスミドを制限酵素XbaIで切断し、前記TRA領域と連結させてプラスミド、すなわちシャトルベクターを作製する。

この時、TRA領域が各々逆向きそう入されたものが得られるが、いづれもキヤンティダ マルトーサ、サツカロマイセス セレビジエ中でARSとして機能することが確認されている。

(実施例)

次に本発明を実施例により更に詳細に説明する。

(実施例1)

新規プラスミドpCS1の作製

キヤンティダ マルトーサ野生株(IAM12247)をYE浦培地(組成:酵母エキス1%,ペプトン2%,グルコース2%)にて30℃,48時間培養後、これより全DNAを抽出し、制限酵素Sau3AIで部分切断、一方サツカロマイセス セレビジエのベクターYEp13(Leu 2を含む)を制限酵素BamHIで切断した。次に双方のDNA

(寒天

2%

得られた形質転換体よりプラスミドDNAを分離し、大腸菌に形質転換を行い、Ap耐性となつたコロニーを選択し、これより新規なプラスミド(pCS1と称する)を分離する。

次いで該アンビシリン耐性となつたプラスミドpCS1をサブクローニング、すなわち制限酵素BamHIにより切断し、キヤンティダ マルトーサの形質転換に必要な部位ARSを含むより小さい領域(TRA)を単離する。

一方、サツカロマイセス セレビジエのベクターYEp13(Leu 2遺伝子を含む)を制限酵素BglIIで切断してLeu 2遺伝子を単離し、また別に大腸菌のベクターpBR322(ボリバー、エフ..ロドリゲス、アル..エル..グリーン、ピー..ジエイ..ペフラック、エム..シー..ハイネッカー、エッチ..エル..ボイヤー、エッチ..ダブリュー..のジーン(Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Belfach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Gene, 2, 95(1977))を制限

をT4DNA連絡酵素を用いて連結反応させた後、大腸菌MC1061株に形質転換させ、Ap(50μg/ml)を含んだ培地(LB培地:トリプトン1%,酵母エキス0.5%,NaCl 1%,pH7.5)で12時間培養した。

生じたAp耐性コロニーのうちテトラサイクリン(Tc)感受性となつたコロニーを2000個得た。これらのコロニーからプラスミドを分離し、キヤンティダ マルトーサのジーンライブラリーとした。

一方、キヤンティダ マルトーサJ288株(ロイシン要求性株)を宿主としてヒンネンらのプロトプラスト形質転換法を用いて、ジーンライブラリーで形質転換させ、ロイシン欠失培地にて再生を行つた。30℃で4~5日間培養後、生育してくれるコロニーを分離し、ロイシン欠失液体培地で培養後、DNAを菌体から分離し、再び大腸菌MC1061株に形質転換させ、Ap耐性となつたコロニーを分離した。この菌体より調製したプラスミドDNAを分離し、これをpCS1と称した。

BEST AVAILABLE COPY

特開昭62-74288(4)

(実施例2)

シャトルベクター pTRA I 及び pTRA II の作製

第1図に示す造成過程によつて説明する。

- (1) プラスミド pCS I を制限酵素 BamH I にて切断し、3.4 Kb の画分（TRA領域と称す）を分離しクレノー（KLENOW）フラグメント酵素（ファーマシア社、スウェーデン）を用いて平滑末端にした。
- (2) プラスミド YEp13 を制限酵素 Bgl II にて切断し Leu 2 遺伝子を分離し、クレノーフラグメント酵素を用いて平滑末端にした。
- (3) 一方大腸菌のベクター ~~pBR~~ 322 を制限酵素 EcoR I にて切断しクレノーフラグメント酵素を用いて平滑末端にした。
- (4) (2)で得られた Leu 2 遺伝子を(3)の pBR322 の EcoR I 切断部位に平滑末端連結反応を行なわせプラスミド pIL I を作製した。
- (5) プラスミド pIL I を制限酵素 Xba I にて切断後クレノーフラグメント酵素を用いて平滑末端

イシン欠失寒天培地に埋め込み、30℃で5~7日間培養を行つた。DNA 1 μgあたりの形質転換株の出現個数を下記の表に示した。

2) リチウム金網法

木村らの方法に従い、菌体を 0.5 M LiCl, 3.5% ポリエチレングリコール 6000 及び DNA を含む溶液中に、30℃ 60 分間保溫した後、ロイシン欠失寒天培地にまくと、30℃ 4~5 日後にコロニーの出現頻度を求めた。表は DNA 1 μgあたりのコロニー数を示す。

表

プラスミド	プロトプラスト法		リチウム金網法
	サツカロマイセス セレビジエ	キヤンディダ マルトーサ	
pCS I	1650	330	280
pTRA I	3080	1650	510
pTRA II	920	460	60

にした。

(6) (1)で得られたTRA領域を(5)の pIL I の Xba I 切断部位に平滑末端連結反応を行なわせTRA領域のそり入方向が互いに逆向きである pTRA I 及び pTRA II を作製した。

尚、この pCS I からの「TRA」領域のサブクローニングとその制限酵素地図及びARS活性と挙動を共にするロイシン要求性の有無は第2図(1)回に示す通りであつた。

(実施例3)

シャトルベクターのキヤンディダ マルトーサ及びサツカロマイセス セレビジエにおける発現

宿主菌としてキヤンディダ マルトーサ J 288 株（ロイシン要求株）とサツカロマイセス セレビジエ AH 22 株（ロイシン要求株）を用いた。

[方法] 1) ヒンネンラのプロトプラスト法

菌体をジモリニアーゼ (Zymolyase) で処理して、プロトプラスト化を行ない、ポリエチレングリコール 4000 及び CaCl₂ を添加し、1.2 M ソルビトールを含むロ

(実施例4)

キヤンディダ マルトーサにおけるシャトルベクターの増殖時期での保持安定性

プラスミド pTRA I 及び pTRA II のキヤンディダ マルトーサ J 288 株内での保存安定性を調べるためにつきの実験を行つた。ロイシン欠失培地で培養したキヤンディダ マルトーサの形質転換株を安全栄養液体培地に移植し、30℃で 15 世代培養した。第3図中に示した時期にサンプリングして完全栄養寒天培地でコロニーを形成させ、各コロニーのロイシン要求性を検討した。

第3図から判るよう pTRA I 及び pTRA II はキヤンディダ マルトーサ J 288 株内で安定に保持された。特に pTRA I の安定性は著しかつた。

[発明の効果]

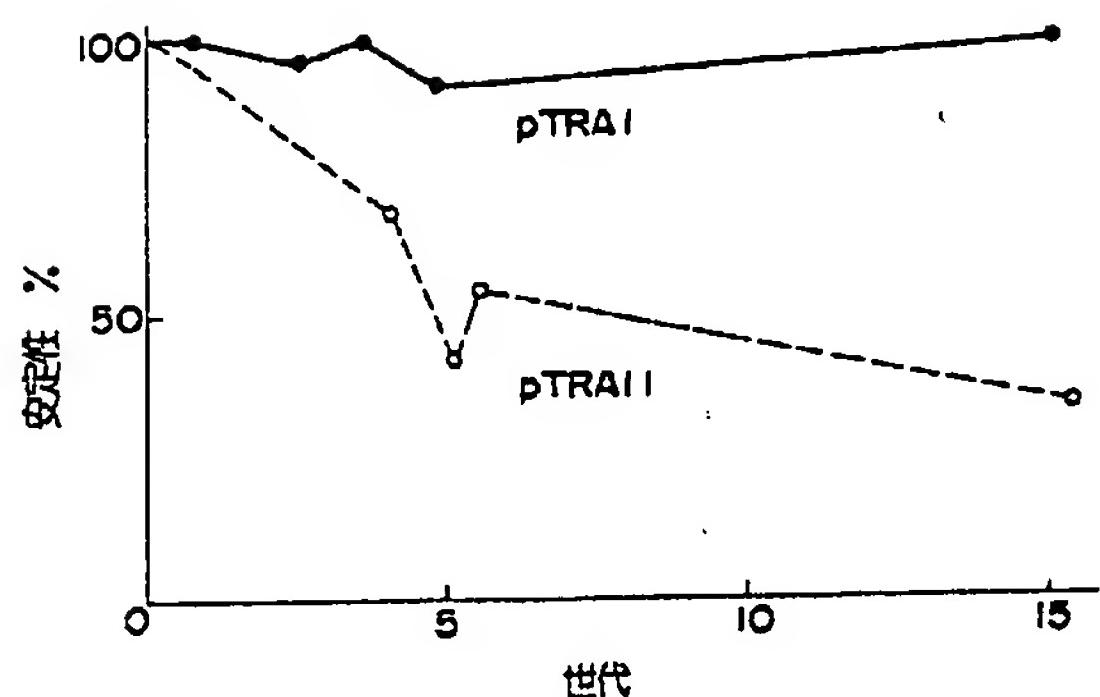
以上説明したように、本発明のプラスミドによれば大腸菌とキヤンディダ マルトーサ間だけでなく、さらにサツカロマイセス セレビジエの細胞内においても複製が可能かつ安定に維持されるシャトルベクターとして利用することができます。

特開昭62-74288(5)

4. 図面の簡単な説明

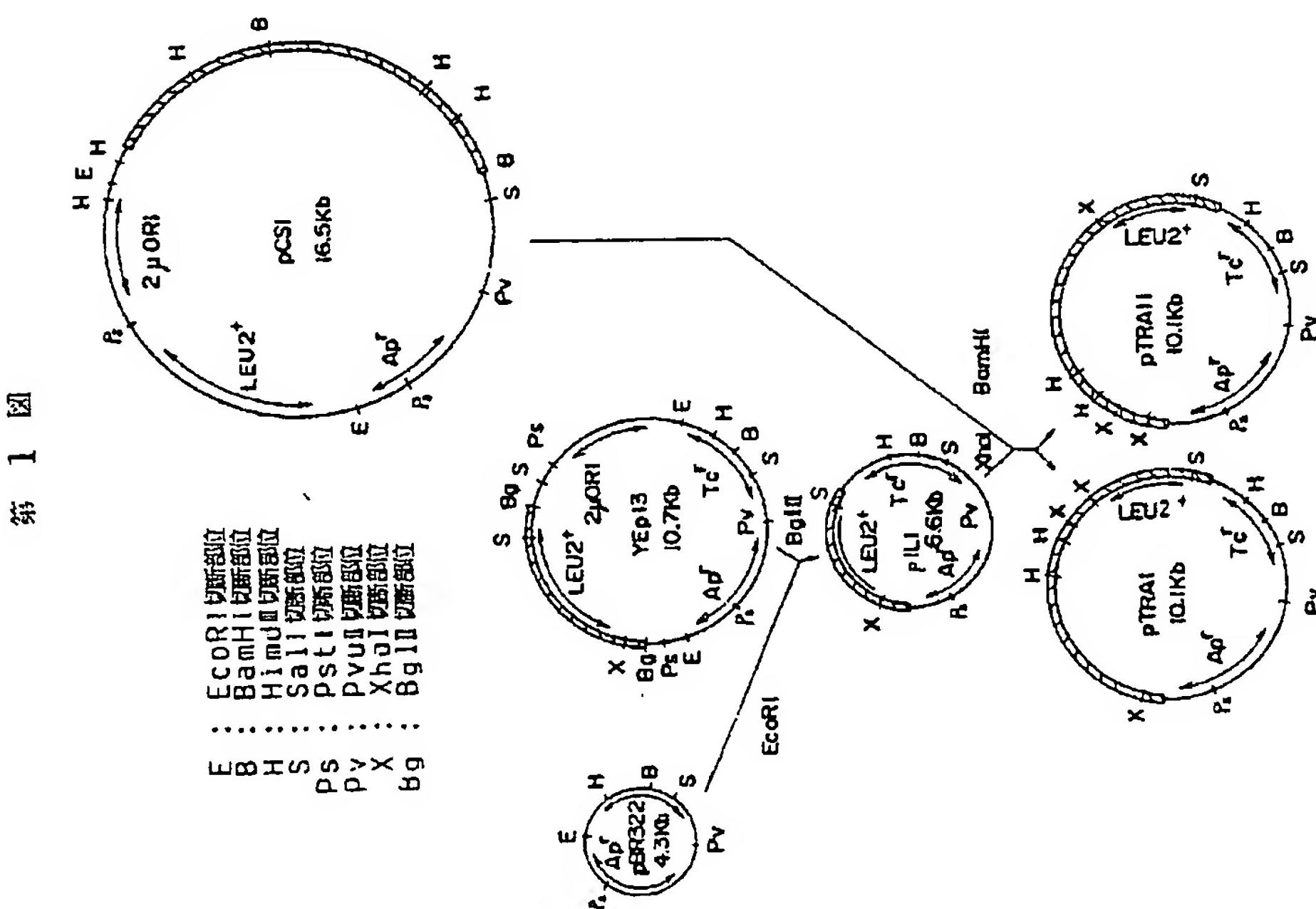
第1図は本発明のプラスミドpTRA I 及びpTRA II の制限酵素地図、およびこれらプラスミドの造成経過を示すものである。第2図(1)回はプラスミドpCS I からの「TRA」領域のサブクローニングとその制限酵素地図及びARS活性と挙動を共にするロイシン要求性の有無、を示す。第3図は本発明のプラスミドpTRA I 及びpTRA II のキャンティダ マルトーサ内での安定性を示すグラフである。

第3図



代理人 渡邊一平

図面の添付(内容に変更なし)

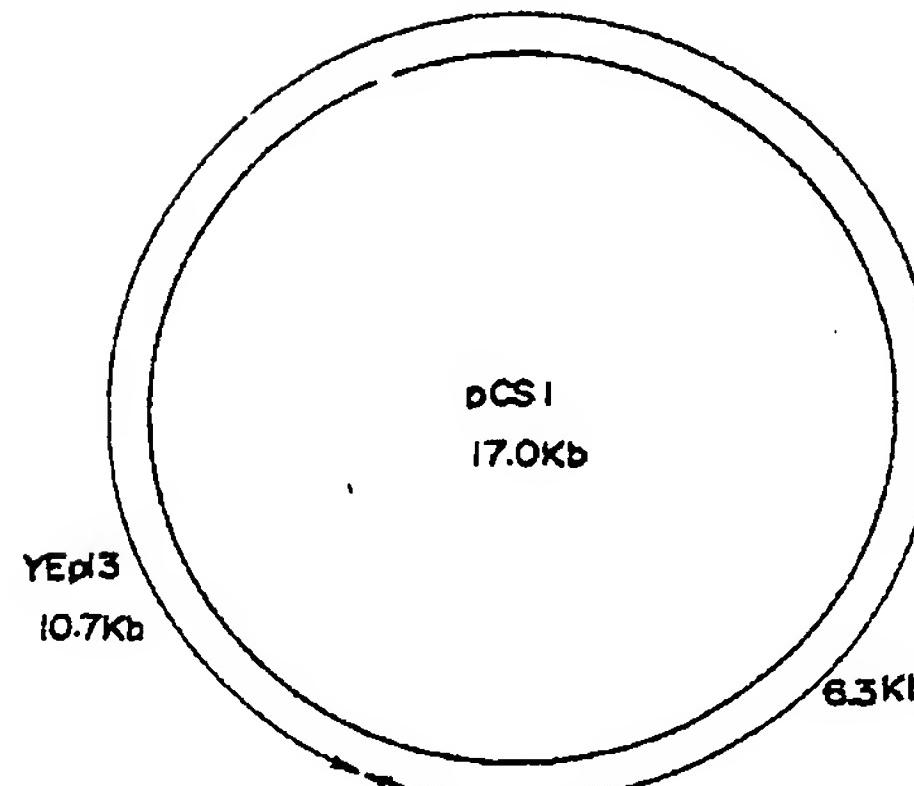


第1図

BEST AVAILABLE COPY

特開昭62-74288(6)

第2図
(イ)



(ロ)

ロイシン欠失培地での成長

キャンディダ マルトーサ のクローニング断片

6.3Kb

+++

TRA領域

++

(3.4Kb)

-

B: BamHI 切断部位
H: HindII 切断部位

手 続 補 正 書 (方式)

昭和61年2月8日

特許庁長官 宇賀 道郎殿

1 事件の表示

昭和60年特許第212188号

2 発明の名称

プラスミドとその製法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区南青山5丁目4番31号

名称 ニッカウヰスキ一株式会社

4 代理人 〒104

住所 東京都中央区新川2丁目10番6号

電話03(555)2501

氏名(8861)弁理士 渡辺 一平

5 補正命令の日付(発送日)

昭和61年1月28日

6 補正の対象

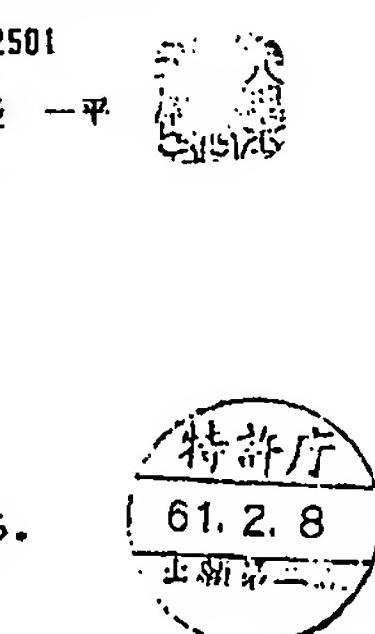
図面

7 補正の内容

全図を別紙添付図面に補正する。

8 添付書類の目録

図面



特許庁

61.2.8

出願人

1通